

На правах рукописи



Сираева Зульфира Юнысовна

**БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА
И ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БОЛЕЗНЕЙ НА ОСНОВЕ
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS ВКПМ В-11008**

03.02.03 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена на кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета
ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент – **Захарова Наталия Георгиевна**

Официальные оппоненты:

Багаева Татьяна Вадимовна – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань;

Дегтярева Ирина Александровна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией агроэкологии и микробиологии государственного научного учреждения "Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения" Российской академии сельскохозяйственных наук, Казань.

Ведущая организация: ГНУ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Казань.

Защита состоится « 15 » ноября 2012 г. в 13.00ч. на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

Факс 8(843) 238-71-21, 233-78-40. *E-mail*: zsiraeva@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Автореферат разослан «___» _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Абрамова З.И.

Актуальность. Ведущий вклад в мировой экологический кризис по загрязненности почв и сельскохозяйственных продуктов питания вносит массовое применение пестицидов и минеральных удобрений (Соколов и др., 2010; Pitann et al., 2009; Frossard et al., 2009). Вместе с тем, в условиях сложной фитосанитарной ситуации на посевах сельскохозяйственных культур, значительной пораженности посевного и посадочного материала и инфицированности пахотных земель фитопатогенными микроорганизмами полный отказ от использования средств защиты растений и агрохимикатов невозможен (Захаренко, 2012; Hajihassani et al., 2012). Распространение таких опасных болезней, как корневые гнили, мучнистая роса, ржавчина, фузариоз, пятнистости различной этиологии, фитофтороз, бактериозы, часто носит эпифитотийный характер и приводит к чрезвычайно высоким потерям урожая, а заселение почвы комплексами токсинообразующих грибов сопровождается порчей продукции (Говоров и др., 2011; Гагкаева и др., 2011; Торопова и др., 2011; Miller et al., 2009; Petter & McMullen, 2010; Hajihassani et al., 2012).

Однако высокая стойкость пестицидов, неспецифичность их действия и накопление в окружающей среде токсических остатков неизбежно приводит к глубоким изменениям в экосистемах: формированию устойчивых рас возбудителей болезней (Чекмарев, 2012; Heimbach, 2010); уменьшению численности полезных членов микробиоты природных биоценозов (Сысоева и др., 2010); снижению биологической активности почвы (Турусов и др., 2010; Mikanova & Šimon, 2009).

В сложившихся условиях мировое сельскохозяйственное производство ориентировано на экологизацию (Bigler, 2010; Pérez-García et al., 2011; Yin et al., 2011; Mohammadi, 2012). Достигнутый к настоящему времени уровень биологизации растениеводства варьирует в отдельных странах от 1.5-2.0 (США) до 9.0-10.0% (Швеция) (Kabaluk et al., 2010). В ряде стран Западной Европы на значительных площадях сельхозугодий реализуется программа полного отказа от применения средств химической защиты или предоставления биометоду значительных преимуществ (Andermatt, 2010; Gessler et al., 2010).

Отставание России в области биологической защиты растений от развитых стран, по мнению исследователей, велико (Говоров и др., 2011; Захаренко, 2011a; Dzun, 2009). В «Концепции развития аграрной науки и научного обеспечения агропромышленного комплекса Российской Федерации на период до 2025 года», принятой РАСХН, важное значение отводится созданию инновационных биопрепаратов по защите растений, которые позволят снизить пестицидную нагрузку на единицу площади и содержание остаточных количеств пестицидов в продукции растениеводства, сохранить биоразнообразие, стабилизировать фитосанитарную обстановку, сократить уровень потерь урожая и увеличить

уровень рентабельности производства (Гончаров, 2011; Говоров и др., 2011; Санин и др., 2012).

Одним из наиболее перспективных направлений в борьбе с возбудителями заболеваний растений является использование биопрепаратов на основе бактерий из рода *Bacillus*. В настоящее время известен ряд препаратов на основе бацилл (фитоспорин-М, бактофит, гамаир, интеграл и другие), однако в некоторых случаях их применение характеризуется недостаточной фунгицидной активностью против корневых и прикорневых гнилей (Зазимко и Найденов, 2009; Саранцева и др., 2011; Курылева и Фатыхов, 2012), листостеблевых болезней (Зазимко и Долженко, 2011), неспецифической плесневой микрофлоры (Злотников и др., 2007; Саранцева и др., 2011), а также сдвигом равновесия в сообществе микроорганизмов в сторону увеличения возбудителей болезней, сокращению численности сапрофитной почвенной микробиоты, что негативно воздействует на фитосанитарное состояние почвы и снижает урожайность (Кравец и др., 2010; Зазимко и Долженко, 2011).

Самым существенным ограничением многих используемых, в том числе бациллярных, биопрепаратов в рамках экологического земледелия является их функциональная моно- или дивалентность. Вместе с тем, представляет интерес с точки зрения современных агротехнологий применение в сельскохозяйственном производстве биопрепаратов комплексного действия, обладающих несколькими видами полезной активности (фунгицидной, рострегулирующей, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей, позитивным действием на показатели плодородия почвы) (Петров и Чеботарь, 2011; Todd et al., 2010; Pérez-García et al., 2011; Mohammadi, 2012).

В связи с вышеизложенным, **целью** настоящей работы явилось создание и обоснование эффективности применения в сельскохозяйственном производстве биопрепарата комплексного действия на основе бактерий из рода *Bacillus*.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Выделить региональные штаммы бактерий из рода *Bacillus* и отобрать штамм, обладающий антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микромицетам, способностью синтезировать ферменты (хитиназу, фосфатазу, нитрогеназу), не проявляющий токсического действия по отношению к растительным и животным объектам.

2. Разработать технологию получения жидкой препаративной формы биопрепарата с использованием в качестве источника сырья отходов промышленных производств и подобрать специальные компоненты, обеспечивающие сохранение жизнеспособности штамма-продуцента биопрепарата и его активностей в процессе хранения.

3. Определить влияние биопрепарата на показатели биологической активности почвы и ее плодородие (активность почвенных ферментов,

способность к мобилизации фосфатов из труднорастворимых соединений фосфора и нитрогеназную активность почвы).

4. Установить уровень пораженности семян различных сортов яровых зерновых культур фитопатогенными микроорганизмами до и после обработки зерен биопрепаратом.

5. Определить влияние химических фунгицидов, инсектицидов и гербицидов на жизнеспособность клеток штамма-продуцента биопрепарата и эффективность протравливания семян яровых зерновых культур при совместном применении биопрепарата с химическими фунгицидами, взятыми в производственных и половинных от рекомендованных в производстве дозах.

6. Оценить эффективность применения биопрепарата в качестве протравителя семян в условиях производственных испытаний.

Научная новизна. Впервые выделен региональный штамм, относящийся к виду *Bacillus amyloliquefaciens*, одновременно обладающий комплексом свойств: антагонистической активностью к широкому спектру возбудителей заболеваний растений; стимулирующим действием на рост и развитие растений; способностью фиксировать молекулярный азот в чистой культуре, воспроизводимой в условиях почвенного экоценоза; фосфатмобилизующей активностью; позитивным действием на ферментативную активность почвы; не проявляющий токсического эффекта на растительные и животные объекты; совместимый с используемыми в сельскохозяйственном производстве фунгицидами на основе манкоцеба, мефеноксама, карбендазима, беномила, хлорокиси меди, флудиоксонила, тирама, тритиконазола, инсектицидами на основе тиаметоксама, бенсултапа, ацетамиприда, фипронила, гербицидами на основе глифосата, клопиралида.

Впервые разработан биопрепарат, способствующий при протравливании семян яровых культур пшеницы и ячменя снижению уровня их пораженности на 96.5-100.0% и обеззараживанию зерен от возбудителя оливковой плесени (*Cladosporium herbarum*), черной (*Xanthomonas sp.*) и базальной пятнистости (*Pseudomonas sp.*) зерновых культур, плесневых грибов из родов *Penicillium* и *Mucor*. Показано, что одним из механизмов реализации антагонистического действия *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 является синтез хитиназы.

Научно-практическая значимость работы. Результаты работы способствуют решению проблемы стабилизации фитосанитарного состояния семенного фонда и посевов зерновых культур, повышения уровня почвенного плодородия и урожайности растений. Штамм-продуцент биопрепарата депонирован в ВКПМ при ФГУП ГосНИИгенетика (Москва) под коллекционным номером ВКПМ В-11008. На основе *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 обоснована технология производства биопрепарата в жидкой форме с использованием в качестве сырья для культивирования бактерий отхода

зерноперерабатывающего производства (пшеничные отруби) и в качестве стабилизатора биомассы, консерватора и прилипателя гуматов, обеспечивающих продление срока хранения биопрепарата.

Отработан способ применения (протравитель семян) и норма расхода (1.5 л/т) биопрепарата для улучшения фитосанитарного состояния семенного фонда яровых зерновых культур и посевов яровой пшеницы. Показанная нами в лабораторных исследованиях и производственных испытаниях эффективность предпосевной обработки биопрепаратом зерен яровой пшеницы позволяет нам рекомендовать биопрепарат к использованию в сельскохозяйственном производстве в качестве протравителя семян. Установленная в работе эффективность совместного применения биопрепарата с химическими фунгицидами, взятыми в половинных от рекомендуемых норм расхода, а также совместимость с гербицидами и инсектицидами, позволяют нам рекомендовать биопрепарат к использованию в интегрированных системах защиты растений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Из выделенных изолятов бацилл штамм *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 обладает антагонистической активностью к широкому спектру возбудителей заболеваний растений и стимулирующим действием на рост и развитие растений.

2. Применение биопрепарата, созданного на основе *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, позволяет повысить уровень почвенного плодородия и режим минерального питания растений вследствие наличия фосфатмобилизующей активности, повышения активности почвенных ферментов, способности к фиксации молекулярного азота.

3. Биологическая эффективность биопрепарата, используемого в качестве протравителя семян яровой пшеницы при норме расхода 1.5 л/т зерна, против основных болезней яровой пшеницы составляет в среднем 56.2-82.4%.

4. Биопрепарат совместим с химическими фунгицидами, инсектицидами и гербицидами. Протравливание семян зерновых культур баковыми смесями бацизулина с фунгицидами сопровождается устранением ретардантного действия фунгицидов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Работа выполнена в соответствии с тематическим планом КФУ, регистрационный номер 01200955076, «Механизмы регуляции функциональной активности клеток». Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на II съезде Хитинового общества и VII Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Санкт-Петербург–Репино,

2003); Международной конференции «Роль почвы в формировании естественных и антропогенных ландшафтов» (Казань, 2003); научно-практической конференции «Биотехнологии – на поля Татарстана» (Казань, 2004); Международной научной конференции «Экология и биология почв» (Ростов-на-Дону, 2004); II Международной научной конференции «Биотехнология – охране окружающей среды» и III школе-конференции молодых ученых «Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов» (Москва, 2004); IX Международной конференции «Окружающая среда для нас и будущих поколений» (Самара, 2004); Всероссийской научной конференции «Современные аспекты экологии и экологического образования» (Казань, 2005); Международной научной конференции «Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем» (Ростов-на-Дону, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 6 статей в центральных отечественных рецензируемых журналах: Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук, Токсикологический вестник и Ученые записки Казанского университета, секция естественные науки.

Место выполнения работы. Казанский (Приволжский) федеральный университет.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 196 страницах машинописного текста, включает 16 рисунков и 32 таблицы. Библиография содержит 297 наименований, в том числе 98 – зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве основных объектов исследования использовали выделенные из различных экологических ниш региональные штаммы бактерий из рода *Bacillus*, коллекционные (ВКМ, Москва; ВНИИЗР, Санкт-Петербург) и региональные штаммы фитопатогенных микромицетов, семена различных сортов яровых культур пшеницы и ячменя, белые беспородные крысы, химические фунгициды, гербициды, инсектициды и почвенные образцы чернозема выщелоченного тяжелосуглинистого, отобранного на территории Республики Татарстан.

Определение уровня антагонистической активности бактерий. Антагонистическую активность штаммов *Bacillus* выявляли методом лунок (Егоров, 1994). Оценку антагонистической активности осуществляли на 7-е сут инкубации по диаметру стерильных зон в грибном газоне, образующихся вокруг лунок.

Определение ферментативной активности бактерий. Общую хитиназную активность определяли по количеству образующихся в результате гидролиза хитина редуцирующих сахаров с динитросалицилловым реагентом (ДНС-метод) (Актуганов, 2000). Удельную активность определяли как отношение величины общей ферментативной активности в культуральной жидкости к величине оптической плотности роста (СФ-46, $\lambda=590$ нм) и выражали в усл.ед.

Активность ФМЭ определяли с использованием в качестве субстрата *n*-нитрофенилфосфата (Лещинская, 1980) и выражали в мкМ расщепленного субстрата, гидролизуемого 1 мл ферментного раствора за 1 мин инкубации. Для пересчета использовали калибровочную кривую зависимости поглощения раствора при $\lambda=410$ нм от концентрации *n*-нитрофенола.

Нитрогеназную активность *Bacillus* определяли ацетиленовым методом, который основан на способности нитрогеназы восстанавливать ацетилен до этилена в количестве, пропорциональном количеству азота, с использованием газового хроматографа (Калининская и др., 1981). Активность нитрогеназы выражали в мкг N₂/мл×ч.

Определение фитотоксической активности штаммов *Bacillus*. Фитотоксическую активность штаммов *Bacillus* исследовали методом замачивания семян растений и по методу Берестецкого (Лещинская, 1993). Наличие фитотоксинов в составе выделяемых бактериями метаболитов выявляли по накоплению биомассы наземной и корневой частей проростков, показателям всхожести и энергии прорастания семян.

Выявление цитогенотоксической активности штаммов *Bacillus*. Цитогенетическую токсичность выявляли по изменению митотической активности клеток пророщенных семян лука репчатого *Allium cepa* (сорт Каба) и скерды зеленой *Crepis capillaris* (Дубинина, 1978). Анализ аберраций проводили метафазным методом на пророщенных семенах скерды (Семенов и др., 2000).

Определение токсичности штаммов *Bacillus* для теплокровных животных. Определение параметров токсичности штаммов *Bacillus* для теплокровных животных проводили в соответствии с методическими указаниями (Методические указания, 1991). Параметры острой токсичности изучали при однократном внутрижелудочном введении бактериальных культур в дозах 1.0×10^{10} , 0.5×10^{10} , 0.25×10^{10} КОЕ/кг массы тела животного (по 12 самцов и 12 самок на дозу) с последующим наблюдением за животными в течение 14 суток, хронической токсичности – при внутрижелудочном введении малых доз (1.0×10^8 , 1.0×10^7 , 1.0×10^6 КОЕ/кг) по 5 раз в неделю в течение 6 месяцев (по 12 самцов и 12 самок на дозу). Определение острой дермальной токсичности проводили путем накожной аппликации салфетки, пропитанной

бактериальной культурой без разведения или 50%-ным водным раствором (в дозах 0.25×10^{10} или 0.125×10^{10} КОЕ/кг соответственно). В контрольных вариантах использовали стерильную воду в эквивалентном объеме. Дисбиотическое действие штаммов *Bacillus* в остром, хроническом эксперименте и при изучении кумулятивного эффекта выявляли путем анализа бактериоценоза кишечника. Для выявления энтеробактерий использовали селективные среды: Эндо, Левина, Плоскирева, Олькеницкого. Гемолизирующую и кокковую микрофлору выявляли на МПА с добавлением 5% донорской крови. Анаэробы и микроаэрофилы выделяли в специальных полужидких средах для выращивания бифидобактерий и лактобактерий. Микроскопическое изучение структуры сердца, легких, селезенки, тимуса, лимфоузлов, печени, почек, кишечника у животных, получивших максимальные испытываемые дозы, проводили после приготовления гистологических препаратов (Ромейс, 1953). Диссеминационный эффект в остром и хроническом экспериментах определяли методом отпечатка частей органов на поверхность МПА. Клинические анализы периферической крови белых крыс проводили согласно (Меньшиков, 1987).

Определение таксономической принадлежности штамма-продуцента биопрепарата. Фенотипические признаки штамма-продуцента биопрепарата изучали согласно (Сайманова и Захарова, 1980; Захарова и др., 2005). Таксономическую принадлежность штамма определяли при помощи анализа сигнатурных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК и *gyrA* в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью множественного выравнивания в программе BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). ПЦР-амплификацию фрагментов генов проводили по стандартной методике (Sambrook et al., 2001) в циклере MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-RAD, Сингапур) с использованием синтезированных ООО «НПФ Синтол» (Россия, Москва) универсальных прокариотических праймеров (Weisburg et al., 1991) в случае гена 16S рРНК и видоспецифических праймеров (Clerck et al., 2004) в случае гена *gyrA*.

Продукты ПЦР-амплификации анализировали электрофорезом в 1%-м агарозном геле. Визуализацию ДНК проводили в УФ-свете на трансиллюминаторе UV Transilluminator TFP-M\WL (Vilber Lourmat, Франция), регистрировали с помощью фотографической системы Gel Imager GI-2 (Helicon, Japan). Фрагменты гена из агарозного геля выделяли с помощью набора AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AxyGen biosciences, USA) согласно протоколу фирмы-изготовителя. ДНК-секвенирование проводили с использованием универсальных праймеров (Weisburg et al., 1991) в случае гена 16S рРНК и видоспецифических праймеров (Clerck et al., 2004) в случае гена *gyrA*, синтезированных ООО «НПФ Синтол» (Россия, Москва).

Условия хранения и культивирования штамма-продуцента биопрепарата. Штамм-продуцент биопрепарата хранили в музейной культуре на МПА под слоем минерального масла при температуре +4°C. Препарат получали методом глубинного культивирования. В качестве посевного материала использовали суточную культуру с титром не менее 1.0×10^8 КОЕ/мл, который вносили в количестве 5-10 об.%, дающем оптическую плотность суспензии 0.1 ед. ($\lambda=590$ нм, $l=10$ мм). Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1:7.5 в условиях аэрации (180 об/мин).

Подбор оптимальной для культивирования штамма-продуцента питательной среды. При подборе оптимальной для культивирования бактерий питательной среды в качестве экспериментальных использовали мелассную, пшеничную, картофельно-глюкозную среды (Семенов, 1990), мелассно-кукурузную и пшенично-кукурузную с дополнительным внесением в состав исходных сред кукурузного экстракта из расчета 1.0 г/л. Титр жизнеспособных клеток (N) определяли путем посева предельных разведений клеточной суспензии на МПА с последующим подсчетом КОЕ в 1 мл среды; количество спор – методом посева на МПА предельных разведений суспензии, выдержанной при температуре 90°C в течение 45 мин, с последующим подсчетом КОЕ в 1 мл (Звягинцев, 1991). Аминный азот и содержание сахаров определяли общепринятыми методами (Коренман, 1975).

Подбор специальных компонентов биопрепарата. В экспериментах по подбору специальных компонентов биофунгицида в бактериальную культуру вносили ПВС (Sigma, USA), Na-KMЦ (Sigma, USA) и СГК (Селен, Россия) до концентрации 2.0 и 3.0 об.%. Оценивали титр жизнеспособных клеток и спор, антагонистическую и фитотоксическую активность через 7 сут после внесения.

Определение влияния биопрепарата на ферментативную активность почвы. Обработку почвы биопрепаратом проводили согласно рекомендациям (Хазиев, 2005). Уреазную активность почвы регистрировали, применяя метод Галстяна; протеолитическую активность почвы определяли методом Галстяна и Арутюняна; целлюлазную активность – биохимическим методом, используя в качестве субстрата Na-KMЦ (Хазиев, 2005). Контролем служила почва, стерилизованная сухим жаром в режиме 180°C, 1 ч.

Определение активности азотфиксации почвы. Активность азотфиксации в почве определяли ацетиленовым методом, который основан на способности нитрогеназы восстанавливать ацетилен до этилена в количестве, пропорциональном количеству азота (Звягинцев, 1991).

Определение фосфатмобилизующей активности штамма-продуцента в жидких питательных средах проводили в условиях стационарного культивирования в жидкой среде Муромцева, содержащей неорганические

($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 , AlPO_4) или органические (фитат Ca-Mg, глицерофосфат) соединения фосфора (500 мг/л среды). Среда засеивали стандартными взвешками культуры в экспоненциальной фазе роста из расчета 2.0×10^6 КОЕ/мл. Контролем служили среды с фосфатом без инокулята. В модельном опыте образцы почвы инокулировали бактериальной суспензией (2.0×10^7 КОЕ/г абсолютно сухой почвы). Через 1 и 3 месяца инкубации определяли содержание подвижного фосфора по методу Кирсанова (Агрохимические методы, 1975).

Изучение эффективности применения биопрепарата в качестве протравителя семян зерновых культур. Семена яровых культур пшеницы и ячменя протравливали общепринятым полусухим способом (Смелик и др., 2011) при норме высева всхожих семян 6 млн. зерен на 1 га, нормах расхода биопрепарата 1.5 л/т зерна (расход рабочей жидкости – 10 л/т), эталонных фунгицидов – в соответствии с рекомендованными (Список, 2012). Оценку пораженности обработанных и необработанных семян зерновых культур проводили, используя метод анализа семян во влажной камере и метод развития болезней проростков зерновых культур (ГОСТ 12044-93).

Влияние пестицидов на жизнеспособность клеток бактерий. Влияние пестицидов на жизнеспособность клеток бацилл оценивали методом чашечного подсчета (Луста, 1990). Для этого готовили смеси бактериальной суспензии (конечный титр 5.0×10^9 кл/мл) с фунгицидами (максим, премис тотал, ридомил МЦ, ТМТД, феразим, фундазол, хлорокись меди), инсектицидами (актара, базудин, банкол, корато, моспилан, регент) и гербицидами (лонтрел, раундап).

Определение эффективности протравливания семян биопрепаратом совместно с химическими фунгицидами проводили путем обработки зерен пшеницы (сорт *Люба*) и ячменя (сорт *Раушан*) баковыми смесями биопрепарата 1.5 л/т семян ($1.5\text{--}2.9 \times 10^7$ КОЕ/зерно) с половинными от производственных дозами ТМТД, премиса тотал, фундазола, феразима (Список, 2012).

Определение эффективности биопрепарата в защите яровой пшеницы от болезней. Производственные испытания биопрепарата в качестве протравителя семян проводили по методике полевых и вегетационных опытов (Доспехов, 1985) и в соответствии с указаниями (Сычев и др., 2009). Эталонами сравнения служили фитоспорин-М, п (0.2 кг/т), дивиденд стар, кс (1.0 л/т), колфуго дуплет, кс (2.0 л/т), премис двести, кс (0.2 л/т) (Список, 2012). Площадь делянок по каждому из вариантов – 1.5 га, повторность пятикратная, предшественник – яровой ячмень. Учет распространенности и интенсивности развития болезней пшеницы, а также фенологические наблюдения за ростом и развитием растений осуществляли в соответствии с рекомендациями ВНИИЗР (Ишкова и др., 2002) и Госхимкомиссии РФ (Методические указания, 1985). Структуру урожая определяли по 100 растениям, отобраным из средних проб сноповых образцов. Содержание клейковины и белка в зерне оценивали

стандартными методами (Личко, 2004). Экономическую эффективность биопрепарата рассчитывали как разность между стоимостью сохраненного урожая зерна на единицу площади на обработанном и контрольном вариантах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью электронных таблиц Excel и программы Origin 7.0. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ($p < 0.05$). При статистической обработке результатов производственных испытаний (Доспехов, 1985) определяли средние арифметические и их доверительные интервалы для уровня вероятности 95%. Для оценки существенности частных различий вычисляли ошибку опыта, ошибку разности средних и наименьшую существенную разность ($НСР_{05}$) в абсолютных величинах для 5%-ного уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка антагонистической активности штаммов *Bacillus*

Путем многоступенчатого скрининга по комплексу полезных признаков из выделенных региональных изолятов бацилл нами был отобран штамм *Bacillus* sp.3, проявляющий высокий уровень антагонистической активности к широкому спектру возбудителей заболеваний различных сельскохозяйственных культур: *Fusarium graminearum*, *F.oxysporum*, *F.sambucinum*, *F.solani*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *A.solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*, *Cladosporium herbarum*, *Oospora pustulans*, *Colletotrichum* sp. Диаметр зон ингибирования роста коллекционных штаммов фитопатогенных грибов варьировал в зависимости от вида микромицета от 34.6 ± 2.3 до 41.8 ± 2.5 мм, региональных – от 16.9 ± 0.5 до 38.6 ± 1.8 мм.

Оценка хитиназной, фосфатазной и нитрогеназной активностей штамма *Bacillus* sp.3

В последние годы проводится интенсивное исследование гидролитического комплекса бациллярных ферментов (хитиназы, протеазы, целлюлазы, глюконазы и др.) (Chebotar et al., 2009; Solanki et al., 2012), в котором основную роль в разрушении хитина клеточных стенок грибов несет хитиназа (Мелентьев и др., 2001; Balhara et al., 2011). Нами было установлено, что удельная активность хитиназы в культуральной жидкости *Bacillus* sp.3 составила 14.9 ± 1.0 , 4.1 ± 0.3 и 4.8 ± 0.2 усл. ед. на 6, 8 и 10 сут инкубации соответственно. Это дает нам основания предполагать, что в основе реализации антагонистического потенциала штамма может лежать синтез хитиназы.

К числу перспективных для создания биопрепаратов микроорганизмов относятся штаммы бацилл, способные переводить труднодоступные соединения фосфора в доступные для растений формы (Pérez-García et al., 2011; Mohammadi, 2012). В связи с этим, нами была изучена способность *Bacillus* sp.3 синтезировать фосфатазу. Согласно результатам, фосфатазная активность

Bacillus sp.3 составила 0.56 ± 0.07 , 0.18 ± 0.01 и 0.26 ± 0.02 усл. ед. на 6, 12 и 18 ч инкубации соответственно.

Активность нитрогеназы в культуральной жидкости *Bacillus sp.3* на 8 и 16 ч инкубации составляла $4.1 \pm 0.3 \times 10^{-2}$ и $5.9 \pm 0.04 \times 10^{-2}$ мкг N₂/мл×ч соответственно. Пик активности зарегистрирован в культуре на 24 ч роста ($12.0 \pm 0.07 \times 10^{-2}$ мкг N₂/мл×ч). В течение последующего периода культивирования активность фермента снижалась и составила на 96 ч $3.4 \pm 0.04 \times 10^{-2}$ мкг N₂/мл×ч.

Токсикологическая оценка штаммов *Bacillus*

В дальнейшей работе нами была проведена токсикологическая оценка безопасности применения *Bacillus sp.3* для растительных и животных объектов.

Согласно полученным данным, *Bacillus sp.3* не оказывал токсического действия в отношении проростков кукурузы и гороха (стандартных тест-объектов) и проявил стимулирующее действие на растения пшеницы, которое выражалось в повышении всхожести (на 26% относительно контроля) и энергии прорастания (на 15%) семян, увеличении биомассы наземной и корневой частей растений (на 27 и 61% соответственно).

Анализ клеток корешков *Crepis capillaris* при их проращивании в клеточной суспензии *Bacillus sp.3* без разведения позволил выявить отсутствие ингибирующего действия на митотическую активность. При разведении суспензии в соотношении 1:10, 1:100, 1:200 митотический индекс достоверно увеличивался в 1.2-2.5 раза по сравнению с аналогичными разведениями среды.

Результаты клинических наблюдений общей физиологической активности и массы тела животных, гематологические и биохимические анализы крови, патоморфологические и гистологические исследования показали отсутствие негативного влияния *Bacillus sp.3* на теплокровные объекты. Штамм не диссеминировал в кровь и внутренние органы экспериментальных животных. Это соответствует данным литературы об отсутствии у штаммов-продуцентов биопрепаратов адаптационной способности к тканевому размножению (Омельянец, 1992). Внутривенное введение бактериальной культуры ни в одном из вариантов опыта не приводило к нарушениям количественных и качественных взаимоотношений кишечной микрофлоры организма. Согласно гигиенической классификации пестицидов, штамм относится к пестицидам IV класса опасности (малоопасные).

Выраженная антагонистическая активность в отношении фитопатогенных грибов, способность к синтезу ферментов, отсутствие токсического действия штамма *Bacillus sp.3* позволили нам рассматривать изолят в качестве продуцента биопрепарата. На основании анализа сигнатурной последовательности гена *gyrA* штамм идентифицирован нами как *B. amyloliquefaciens* и депонирован во

Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биопрепарата

Одним из приоритетных способов получения биопрепаратов является глубинное культивирование штаммов-продуцентов (Захаренко и др., 2004).

Как видно из рис. 1, при выращивании бактерий на пшенично-кукурузной среде на 18 ч инкубации выход биомассы составил 5.9 ± 0.3 г/л и достоверно не изменялся в стационарной фазе. Количество жизнеспособных клеток с конца экспоненциальной фазы роста до конца стационарной фазы варьировало от 1.28 ± 0.02 до $1.29 \pm 0.04 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. Выход спор на 18, 20, 22, 24 и 26 ч инкубации составил 50.8, 84.4, 92.2, 93.7 и 94.6% соответственно. Содержание остаточного сахара в среде снизилось с исходного уровня 23.8% до 13.1%, аминного азота – с 15.1 до 1.9% и не изменялось при дальнейшем культивировании.

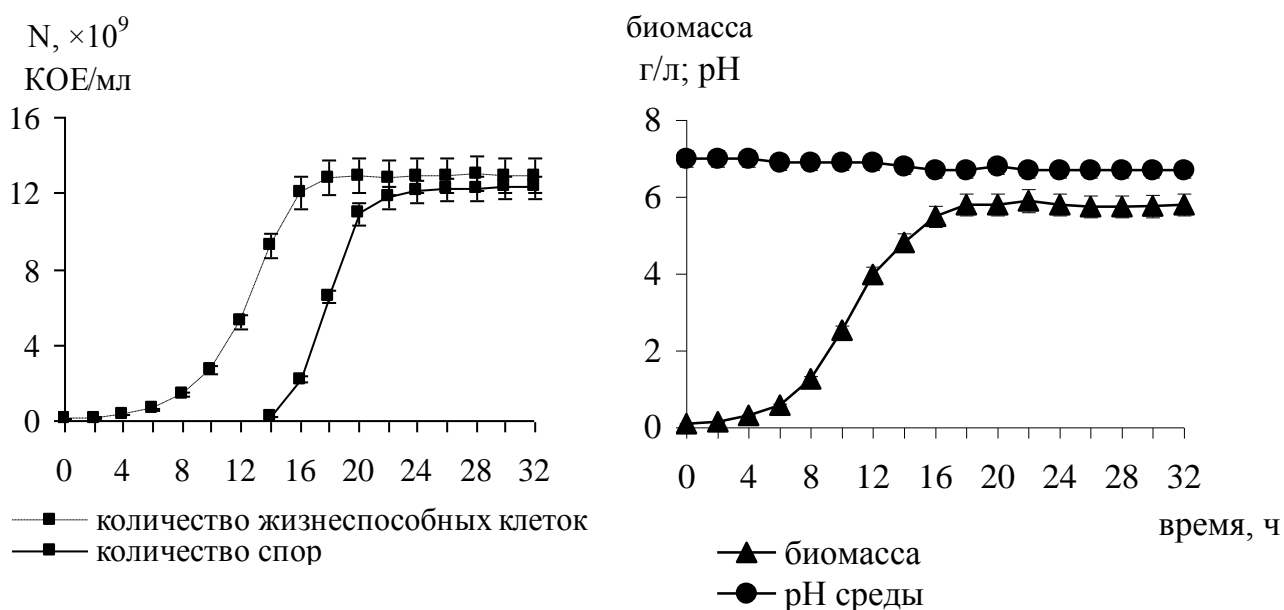


Рис. 1. Динамика роста и интенсивности спорообразования, накопления биомассы и изменения pH среды при культивировании *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 на пшенично-кукурузной среде

Изучение режимов культивирования *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 показало, что максимальная антагонистическая активность и наибольший выход биомассы достигается при 28°C (Табл. 1), максимальное проявление фунгистатической активности – при кислотности среды в интервале 6.0-8.0, а ростовая активность в диапазоне pH от 5.0 до 9.0 (Табл. 1). Это рассматривается нами как преимущественная характеристика штамма-продуцента биопрепарата

в условиях совместного использования со химическими пестицидами, при смешивании которых возможно снижение кислотности до pH 5.5-6.0 (Хайбуллин, 2000), а также в условиях прогрессирующего закисления пахотных почв (Лукманов и др., 2010; Чекмарев и др., 2011).

Таблица 1.

Влияние температуры культивирования и pH питательной среды на антагонистическую активность *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 при выращивании на пшенично-кукурузной среде (26 ч инкубации)

Параметр культивирования		Диаметр зон ингибирования роста, мм		
		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
Температура, °C	20	19.4±1.0	26.7±0.8	35.5±0.8
	28	24.0±0.8	33.1±0.7	40.2±0.9
	37	18.8±0.6	28.5±1.1	36.0±0.8
pH	5.0	20.7±0.9	30.2±0.8	35.4±0.7
	6.0	25.9±0.8	36.2±1.1	43.8±1.1
	7.0	26.5±1.1	37.0±1.0	44.1±1.2
	8.0	24.6±1.0	35.9±0.7	42.9±0.8
	9.0	21.5±0.9	32.0±0.6	36.0±0.7

С целью сохранения жизнеспособности *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008, стабилизации микробной биомассы и увеличения адсорбционной способности клеток и спор нами была проведена сравнительная оценка влияния внесения в состав бактериальной суспензии ПВС, Na-КМЦ и СГК, взятых в концентрациях 2.0 и 3.0 об.%. Внесение в бактериальную культуру СГК (2.0%) в качестве стабилизатора биомассы, пленкообразователя и прилипателя обеспечивало сохранение жизнеспособности клеток *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 на уровне 99%, исходной антагонистической и ростстимулирующей активностей. Биопрепарат в жидкой препаративной форме, в состав которого были введены СГК (2.0 об.%), получил рабочее название бацизулин.

Действие бацизулина на ферментативную активность почвы

Важным показателем уровня эффективного плодородия почвы является ее ферментативная активность, отражающая деятельность почвенной биоты (Бабушкина и др., 2008). В связи с этим, исследовали влияние биопрепарата на уреазную, протеазную и целлюлозолитическую активности почвы.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, на 1 сут после внесения биопрепарата в почву происходит резкое увеличение уреазной активности – на 86.0% по сравнению с контролем. На 7 сут эффект стимулирования активности уреазы снижается до 48.4%. На 15 сут выявлено повышение уреазной активности до 72.2% по сравнению с контролем и последующее понижение на 30 и 45 сут до уровня контроля.

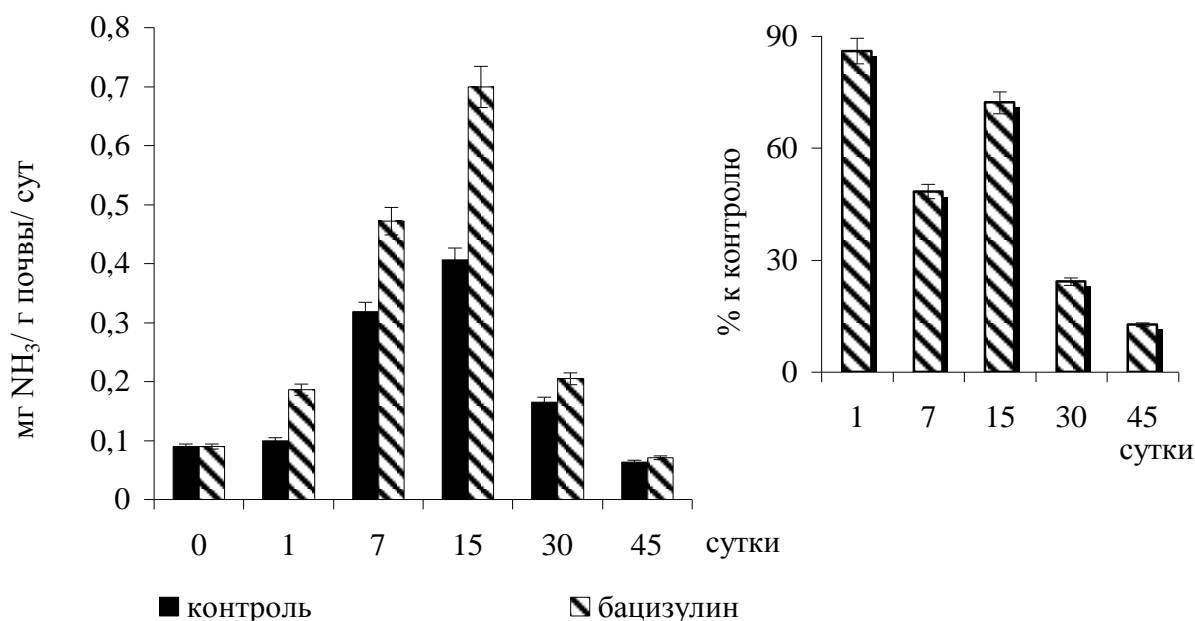


Рис. 2. Влияние бацилулина на уреазную активность почвы

Внесение биопрепарата оказывает незначительное влияние на активность протеазы на 1, 7, 15 сут в сторону ее увеличения, не превышающего 24.3% относительно контроля (Рис. 3). Однако на 30 и 45 сут происходит усиление активности фермента (на 50.5 и 59.0% соответственно).

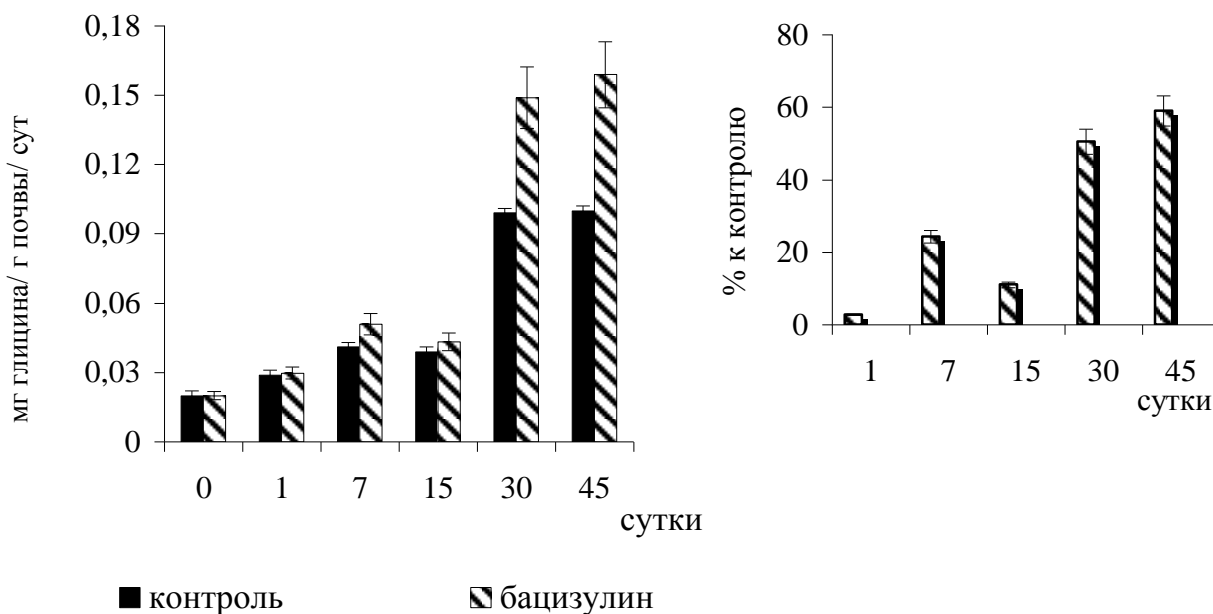


Рис. 3. Влияние бацилулина на протеазную активность почвы

Важной характеристикой трансформации органического вещества является проявление целлюлозолитической активности в почве (Бабушкина и др., 2008). Данные проведенных нами исследований показали, что внесение биопрепарата оказывает достоверное стимулирующее действие на активность почвенной целлюлазы (от 10.6 до 23.8% по сравнению с контролем).

Влияние бацизулина на нитрогеназную активность почвы

Определение влияния биопрепарата на процесс потенциальной азотфиксации показало, что наибольший эффект стимулирования нитрогеназной активности на протяжении опыта отмечался на 1, 7 и 15 сут – 47.3, 88.6 и 30.7% соответственно по сравнению с контролем (Рис. 4).

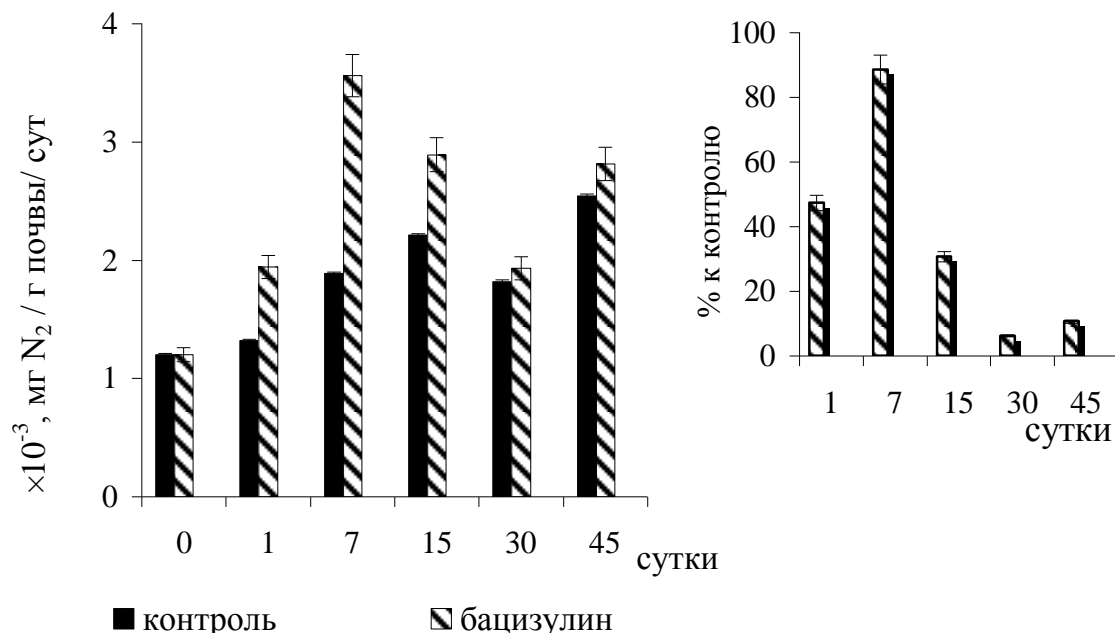


Рис. 4. Влияние бацизулина на нитрогеназную активность почвы

Солюбилизация штаммом *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008

труднорастворимых органических и неорганических соединений фосфора

Штамм *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 характеризуется способностью к мобилизации фосфора из его труднодоступных органических и неорганических соединений с накоплением в питательной среде P_2O_5 за 6 сут инкубации в количестве от 32 до 230 мг/л (Табл. 2, 3), что сопоставимо с солюбилизирующей активностью коммерческих штаммов бацилл, входящих в состав биоудобрений (Prassanna et al., 2011; Mohammadi, 2012).

Таблица 2.

Накопление P_2O_5 в процессе роста *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 в средах с труднорастворимыми органическими соединениями фосфора

Источник фосфатов в питательной среде	Содержание жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		Накопление P_2O_5 в культуральной жидкости, мг/л		рН	
	0 сут ($\times 10^6$)	6 сут ($\times 10^9$)	3 сут	6 сут	0 сут	6 сут
Фитин	2.0 \pm 0.15	0.5 \pm 0.18	32.1 \pm 2.4	62.9 \pm 4.7	7.0	6.0
Глицерофосфат	2.0 \pm 0.15	3.2 \pm 0.24	58.3 \pm 4.2	184.0 \pm 5.5	7.0	5.5

Таблица 3.

Накопление P_2O_5 в средах с труднодоступными неорганическими соединениями фосфора в процессе развития *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008

Источник фосфатов в питательной среде	Содержание жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		Накопление P_2O_5 в культуральной жидкости, мг/л		рН	
	$\times 10^6$ 0 сут	$\times 10^9$ 6 сут	3 сут	6 сут	0 сут	6 сут
$Ca_3(PO_4)_2$	2.0 \pm 0.15	2.5 \pm 0.05	88.0 \pm 3.2	230.3 \pm 5.7	7.0	5.6
$AlPO_4$	2.0 \pm 0.15	1.6 \pm 0.10	48.4 \pm 1.8	86.8 \pm 4.0	7.0	5.3
$FePO_4$	2.0 \pm 0.15	1.0 \pm 0.10	35.9 \pm 2.0	54.5 \pm 3.8	7.0	5.0

По доступности для *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 органические соединения фосфора распределяются следующим образом: глицерофосфат > фитин (Табл. 2), а минеральные: $Ca_3(PO_4)_2$ > $AlPO_4$ > $FePO_4$ (табл. 3). Следует отметить наличие способности *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 растворять фосфат железа и алюминия, так как, по данным литературы, продуценты многих биопрепаратов на основе *B.suttilis* (фитоспорин-М, интеграл и другие) не могут растворять $FePO_4$, а 10 из них – также и $AlPO_4$ (Egorshina et al., 2011).

Возможность усиления фосфорного питания растений путем мобилизации труднодоступных соединений фосфора в пахотном слое дерново-подзолистой почвы изучали в модельном опыте. При внесении бацизулина суммарное содержание подвижных форм фосфора через 1 и 3 месяца инкубации превысило контрольный уровень на 24 и 37 мг/кг почвы.

Солюбилизация соединений фосфора сопровождается уменьшением рН (Табл. 2, 3), что, по нашему мнению и мнению других исследователей (Prassanna et al., 2011; Mohammadi, 2012), указывает на возможную зависимость солюбилизации фосфатов штаммом *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 от образования кислот. Известно, что снижение рН играет ведущую роль в процессе растворения $Ca_3(PO_4)_2$, в то время как при растворении $AlPO_4$ и $FePO_4$ ключевыми являются процессы хелатообразования (Pérez-García et al., 2011). Таким образом, можно предполагать наличие у штамма трех механизмов солюбилизации фосфора: изменение рН почвенного раствора за счет выделения кислот и хелатирование катионов, входящих в состав соединений фосфора, с последующим освобождением фосфат-аниона под действием фосфатазы.

Оценка эффективности использования биопрепарата бацизулин в качестве протравителя семян зерновых культур

Использование препаратов в качестве протравителей предусматривает необходимость оценки их эффективности с учетом исходного инфекционного фона посевного материала (Торопова и др., 2011). Фитопатологический анализ

семян различных сортов яровой пшеницы и ярового ячменя, используемых в качестве посевного материала в РФ в 2004 году, показал, что зараженность семян исследуемых культур возбудителем черни (род *Alternaria*) варьировала в зависимости от сорта ярового ячменя в пределах от 24.0 до 83.5% и пшеницы от 29.5 до 100.0%. Наиболее пораженными возбудителем корневой гнили (*B.sorokiniana*) были семена пшеницы сортов *Омская 32* (79.5%) и *Казанский Юбилейный* (87.5%), ячменя сортов *Раушан* (77.0%), *Омский голозерный 1* (90.0%) и *Рахат* (96.5%); наименее – сорт *Казахстанская 10* (3.5%). По результатам фитоэкспертизы, зараженность семян сортов *Люба*, *Лада*, *Казанский Юбилейный*, *Рахат* фузариозом составила 56.0, 65.0, 67.5 и 62.5%.

Доминирующее положение среди микромицетов, вызывающих плесневение семян, занимали представители рода *Penicillium* и *Micor racemosus*. К особенно зараженным следует отнести сорта *Казахстанская 10* и *Челябинский 99*, пораженность которых пенициллезом достигала 87.0 и 89.5%, мукоральной плесенью – 34.0 и 35.0% соответственно. Содержание на семенах пшеницы грибов из рода *Aspergillus* составляло от 2.5 до 24.0%. Зараженность сортов ячменя в отдельных случаях (*Зазерский-85*) достигала 39.0%. Пораженность зерна пшеницы исследуемых сортов, а также ячменя сортов *Омский голозерный 1*, *Челябинский 99* и *Вереск* возбудителем оливковой плесени (*C.herbarum*) находилась в пределах от 2.5 до 16.5%. Доля возбудителя сухой гнили (*p.Nigrospora*) в комплексе микромицетов, населяющих семена пшеницы, составляла от 7.5 до 28.0% в зависимости от сорта. На семенах были обнаружены возбудители пятнистости листьев (*Curvularia spp.*), розовой плесени (*Trichotecium roseum*), серой гнили (*Botrytis spp.*) и др.

На зернах пшеницы сортов *Казахстанская 10* и *Омская 32* доля семян, инфицированных возбудителем черной пятнистости (*Xanthomonas translucens*), составляла 23.0 и 53.0% соответственно, других сортов – от 3.0 до 18.0%.

Протравливание биопрепаратом бацизулин семян сортов *Казанский Юбилейный*, *Казахстанская 10*, *Рахат* и *Вереск* привело к их полному обеззараживанию. Пораженность семян пшеницы сортов *Омская 32*, *Люба*, *Лада* и ячменя сортов *Раушан*, *Омский голозерный 1*, *Челябинский 99*, *Московский-2*, *Зазерский-85*, *Нутанс-778* возбудителем обыкновенной корневой гнили (*Bipolaris*) снизилась по сравнению с контролем в зависимости от сорта на 93.5-100.0%; фузариозом (*Fusarium*) – на 96.2-100.0%; альтернариозом (*Alternaria*) – на 96.1-100.0%. Применение бацизулина способствовало обеззараживанию семян от возбудителя аспергиллеза (*Aspergillus*), септориоза (*Septoria*) и оливковой плесени (*Cladosporium*).

Обработка зерен различных культур фунгицидом максим вызвала снижение их пораженности отдельными фитопатогенными и плесневыми

грибами на 73.3-100.0% по сравнению с контролем, фитоспорином-М – на 50.0-78.8% колфуго супер колор – на 33.3-63.6%, планризом – на 16.7-52.6%.

Совместное применение биопрепарата с пестицидами

В настоящее время многие исследователи придерживаются мнения о необходимости совместного использования биопрепаратов и химические пестицидов (Захаренко, 2011а; Чулкина и др., 2012; Zihlmann et al., 2010). В связи с этим нами было изучено влияние пестицидов на жизнеспособность клеток *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008.

Согласно полученным результатам, фунгициды феразим, ридомил голд МЦ и фундазол, инсектициды актара, банкол, базудин, моспилан, гербициды раундап и лонтрел-300 не оказывали негативного воздействия на жизнеспособность клеток *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008. При использовании премиса тотал и максима в производственной и половинной дозах показатель жизнеспособности снижался на 1 сут зависимости от фунгицида и дозы на 7-12%, в дозе 0.25 производственной негативного воздействия на *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 не отмечено. Среди пестицидов только ТМТД, колорадо и регент на 1 и 4 сут угнетал рост *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 с нивелированием токсического действия на 7 сут. Показатель жизнеспособности бактерий под действием хлорокиси меди увеличивался на 1 и 4 сут (на 25-55% по сравнению с контролем в зависимости от дозы) со снижением количества клеток до уровня контроля на 7 сут.

При протравливании зерен бацизулином в комплексе с фунгицидами, взятыми в производственной и половинной от нее дозах, пораженность фитопатогенными грибами и микромицетами, вызывающих плесневение семян, была достоверно ниже, чем при протравливании зерен только ТМТД, феразимом, фундазолом и премисом тотал, взятыми в производственных (в среднем на 28.6-86.4%) и половинных от них (в среднем на 62.5-94.2%) дозах. ТМТД, феразим и фундазол в исследуемых дозах оказывали достоверное фитотоксическое действие на растение. При их использовании в комбинации с бацизулином фитотоксический эффект нивелировался.

Эффективность бацизулина в защите яровой пшеницы от болезней

Производственные испытания биопрепарата в качестве протравителя семян яровой пшеницы (сорт *Люба*) проводили в 2005 году в Республике Башкортостан. До обработки зараженность семян *B.sorokiniana* составила 19%, фузариозной инфекцией – 49%, альтернариозной – 43%. Среди плесневых грибов лидирующее положение занимали виды из родов *Penicillium* и *Mucor*.

Применение бацизулина, дивиденда стар, фитоспорино-М, колфуго дуплет и премиса двести уменьшило индекс развития корневой гнилью болезни в фазе кущения в 4.5, 4.7, 3.5, 2.8 и 2.4 раза соответственно по сравнению с

контролем (Табл. 4). К концу вегетации эффективность химических фунгицидов, в отличие от биопрепаратов, снизилась.

Таблица 4.

Эффективность протравителей в защите яровой пшеницы от корневой гнили

Вариант	Биологическая эффективность по фазам вегетации, %					
	Кущение		Колошение		Восковая спелость	
	R	БЭ	R	БЭ	R	БЭ
Контроль	14.0	-	27.3	-	34.0	-
Бацизулин	3.1*	77.9	5.3*	80.6	6.0*	82.4
Фитоспорин-М	4.0*	71.4	8.7*	68.1	10.0*	70.6
Дивиденд стар	3.0*	78.6	8.4*	69.2	11.0*	67.7
Колфуго дуплет	5.1*	63.6	11.5*	57.9	14.0*	58.8
Премис двести	5.9*	60.0	14.4*	47.3	21.4*	37.7
НСР ₀₅	3.2	-	4.6	-	5.0	-

Примечание: * – разница между опытом и контролем достоверна при $p \leq 0.05$. R – развитие болезни, %; БЭ – биологическая эффективность, %.

Биологическая эффективность препарата против стеблевой ржавчины пшеницы составляла 74.6%, против септориозной и гельминтоспориозной пятнистостей – 65.0 и 78.8% соответственно.

Протравливание семян пшеницы бацизулином снизило развитие черни и фузариоза колоса в фазу полной спелости на 56.2 и 64.6%, дивидендом стар – на 57.8 и 51.0%, фитоспорином-М – на 51.9 и 56.5%, колфуго дуплет – на 57.8 и 49.7%, премисом двести – на 43.2 и 36.9%. Структурный анализ урожая пшеницы показал, что предпосевная обработка семян бацизулином достоверно увеличивает массу 1000 зерен (на 12.0% по сравнению с контролем), озерненность колосьев (на 6.8%), число продуктивных стеблей (на 8.0%) и повышает урожайность яровой пшеницы на 11.1%.

ВЫВОДЫ

1 Показано, что штамм *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 обладает антагонистической активностью к широкому спектру возбудителей заболеваний растений, ростстимулирующим действием, хитиназной, фосфатазной и нитрогеназной активностями и относится к пестицидам IV класса опасности.

2. Разработана технология получения биопрепарата с использованием пшеничных отрубей в качестве сырья для глубинного культивирования *B.amyloliquefaciens* ВКПМ В-11008 и гуминовых соединений, обеспечивающих сохранение жизнеспособности штамма и его активностей в процессе хранения.

3. Показано положительное влияние внесения бацизулина в почву на активность почвенных ферментов (уреазы, протеазы, целлюлазы), уровень нитрогеназной активности и содержание подвижных форм фосфора.

4. Установлено, что превалирующей инфекцией для семян различных

сортов ярового ячменя являются возбудители из родов *Bipolaris* и *Alternaria* и в меньшей степени – *Fusarium*; для яровой пшеницы – *Alternaria*, реже – *Fusarium* и *Bipolaris*. Протравливание зерен биопрепаратом способствует снижению уровня их пораженности в среднем на 92.5-100.0% в зависимости от сорта, культуры зерновых и возбудителя заболевания.

5. Биопрепарат совместим с фунгицидами на основе манкоцеба, мефеноксама, карбендазима, бенонила, хлорокиси меди, флудиоксонила, тирама, тритиконазола, инсектицидами на основе тиаметоксама, бенсултапа, ацетамиприда, фипронила, гербицидами на основе глифосата, клопиралида. Протравливание семян баковыми смесями бацизулина с фунгицидами сопровождается устранением их ретардантного действия.

6. В производственных испытаниях показано, что биологическая эффективность биопрепарата, используемого в качестве протравителя семян при норме расхода 1.5 л/т зерна, против основных болезней яровой пшеницы составляет в среднем 56.2-82.4%.

Основные публикации по теме диссертации:

1. Сираева З.Ю. Использование бактерий из рода *Bacillus* / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук. – 2004. – №5. – С.71–75. (перечень ВАК), автора – 0,3 пл.

2. Сираева З.Ю. Использование бацизулина в качестве протравителя семян зерновых культур / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук. – 2005. – №5. – С.55–57. (перечень ВАК), автора – 0,18 пл.

3. Сираева З.Ю. Токсикологическая оценка нового протравителя семян зерновых культур биофунгицида бацизулин / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, О.Н. Ильинская, А.В. Гарусов // Токсикологический вестник. – 2006. – №1. – С.30–35. (перечень ВАК), автора – 0,37 пл.

4. Сираева З.Ю. Совместное применение бацизулина с пестицидами / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук. – 2006. – №4. – С.43–45. (перечень ВАК), автора – 0,18 пл.

5. Захарова Н.Г. Эффективность биопрепарата бацизулин в защите яровой пшеницы от болезней / Н.Г. Захарова, **З.Ю. Сираева**, И.П. Демидова, А.В. Гарусов, С.Ю. Егоров, О.Н. Ильинская // Ученые Записки Казанского университета, серия «Естественные науки». – 2006. – Т. 148, кн. 3. – С.89–98. (перечень ВАК), автора – 0,62 пл.

6. Сираева З.Ю. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида бацизулин / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, О.Н. Ильинская // Ученые Записки Казанского

университета, серия «Естественные науки». – 2010. – Т. 152, кн. 4. – С.169–178. (перечень ВАК), автора – 0,62 пл.

7. Сираева З.Ю. Пути повышения плодородия почвы и урожайности сельскохозяйственных культур в Республике Татарстан / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров, А.В. Черемных // Труды Международной конференции «Роль почвы в формировании естественных и антропогенных ландшафтов». – Казань, 2003. – С.434–436.

8. Сираева З.Ю. Хитиная активность природных штаммов *Bacillus sp.*, перспективных для создания биопрепаратов / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, В.И. Вершинина, Д.В. Юсупова, С.Ю. Егоров / II съезд Хитинового общества, VII Международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». – Санкт-Петербург–Репино, 2003. – С.411–413.

9. Егоров С.Ю. Биологическая наука – сельскому хозяйству / С.Ю. Егоров, Н.Г. Захарова, Ф.К. Алимова, Ф.Г. Куприянова-Ашина, **З.Ю. Сираева**, А.В. Черемных // Научно-практическая конференция «Биотехнологии – на поля Татарстана». – Казань, 2004. – С.9–13.

10. Сираева З.Ю. Эффективность инокуляции семян зерновых культур бактериями рода *Bacillus*, перспективными для создания биопрепаратов / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров // Международная научная конференция «Экология и биология почв». – Ростов-на-Дону, 2004. – С.261–266.

11. Сираева З.Ю. Эффективность инокуляции семян зерновых культур бактериями рода *Bacillus*, перспективными для создания биопрепаратов / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров // II Международная научная конференция «Биотехнология – охране окружающей среды» и III школа-конференция молодых ученых и студентов «Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов». – Москва, 2004. – С. 205.

12. Сираева З.Ю. Влияние биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* на биологическую активность почвы / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров // II Международная научная конференция «Биотехнология – охране окружающей среды» и III школа-конференция молодых ученых и студентов «Сохранение биоразнообразия и рациональное использование биологических ресурсов». – Москва, 2004. – С.174–177.

13. Сираева З.Ю. Бацизулин – новый биофунгицид для защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей заболеваний растений / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров, А.В. Черемных, М.Т. Асхадуллина, А.В. Дружинина // IX Международная конференция «Окружающая среда для нас и будущих поколений». – Самара, 2004. – С.77–78.

14. Сираева З.Ю. Совместимость биопрепарата бацизулин с химическими пестицидами / З.Ю. Сираева, Н.Г. Захарова, С.Ю. Егоров, М.Т. Асхадуллина, И.П. Демидова, Е.А. Максимова, О.А. Петрова // Всероссийская научная

конференция «Современные аспекты экологии и экологического образования». – Казань, 2005. – С.480–481.

15. Ильинская О.Н. Дефосфорилирующая активность *Bacillus sp.* / О.Н. Ильинская, Н.Г. Захарова, **З.Ю. Сираева**, И.П. Демидова // Международная научная конференция «Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем». – Ростов-на-Дону, 2006. – С.153–154.

Список сокращений

РАСХН – Российская академия сельскохозяйственных наук;
ВКМ – Всесоюзная коллекция микроорганизмов;
ВНИИЗР – Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений;
усл.ед. – условная единица;
КОЕ – колониеобразующая единица;
МПА – мясо-пептонный агар;
ПВС – поливиниловый спирт;
Na-КМЦ – Na-карбоксиметилцеллюлоза;
СГК – соли гуминовых кислот;
об.% – объемное содержание компонента в смеси;
ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Автор выражает глубокую признательность профессору, д.б.н., академику АН РТ О.Н. Ильинской за предоставление возможности выполнения научных исследований на кафедре микробиологии КФУ; научному руководителю доценту Н.Г.Захаровой за внимательное отношение к работе и плодотворную помощь в обсуждении результатов; доц. В.И. Вершининой и Д.В. Юсуповой за консультацию по определению активностей ферментов; д.м.н., проф. Ю.А. Чельшеву (БГОУВПО КГМУ) за предоставление возможности проведения токсикологической оценки безопасности применения биопрепарата на лабораторных животных на базе кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии; глав.науч.сотр. М.Я. Менликиеву (БашНИИСХ) за консультацию и содействие в проведении производственных испытаний; всем сотрудникам кафедры микробиологии КФУ за всестороннюю помощь.

Особую благодарность автор выражает маме Сираевой Зое Семеновне и отцу Сираеву Юнысу Локмановичу за поддержку, любовь и понимание.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:
420008, Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КФУ, к.104, отдел аттестации, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.08 проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: zsiraeva@yandex.ru